

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018592

International filing date: 13 December 2004 (13.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-412810
Filing date: 11 December 2003 (11.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 10 February 2005 (10.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

15.12.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 1 1 日
Date of Application:

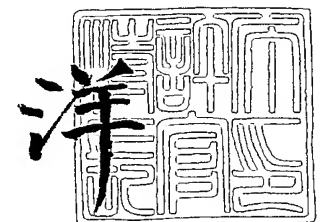
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 1 2 8 1 0
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 4 1 2 8 1 0]

出 願 人 今 井 一 洋
Applicant(s):

2 0 0 5 年 1 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 039928P
【提出日】 平成15年12月11日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 1/00
G01N 33/58
G01N 33/68
G01N 30/72

【発明者】
【住所又は居所】 東京都世田谷区代田 6 丁目 1 5 番 1 8 号
【氏名】 今井 一洋

【特許出願人】
【識別番号】 592191793
【氏名又は名称】 今井 一洋

【代理人】
【識別番号】 100102004
【弁理士】
【氏名又は名称】 須藤 政彦
【電話番号】 03-5202-7423

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 053327
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

被験試料中の発現微量タンパク質及び／又はペプチドを高感度に検出・分離・同定する方法であって、被験試料中のタンパク質及び／又はペプチドを蛍光誘導体とした後、これを蛍光検出により分離し、その蛍光画分を質量分析に付するか、又はその蛍光画分を酵素水解に付し、そのペプチド断片を分離し、その画分を質量分析に付し、データベース照合、構造解析に供して発現タンパク質及び／又はペプチドの同定を行うことを特徴とする上記発現タンパク質及び／又はペプチドの検出・分離・同定方法。

【請求項 2】

被験試料中のタンパク質及び／又はペプチドを蛍光誘導体とした後、HPLCに付し、その蛍光画分を捕集した後、酵素水解に付し、その蛍光標識フラグメント及び非蛍光標識フラグメントを質量分析又はMS/MS分析して得られた各フラグメントのイオン分子量情報をタンパク質及び／又はペプチドフラグメントデータベースと照合し、構造解析する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(1) 被験試料中のタンパク質及び／又はペプチドを蛍光試薬で標識する、(2) それを 1 次元又は 2 次元のHPLC/蛍光検出により、その蛍光画分を捕集する、(3) 上記蛍光画分を酵素水解に付する、(4) それを第二段階のHPLC/蛍光検出により、その蛍光クロマトグラムを得ると共に、その全ピークを質量分析に付し、データベース照合、構造解析に供する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

タンパク質及び／又はペプチド試料の水溶液に、官能基特異的蛍光試薬を加え、場合により、界面活性剤及び／又はタンパク変性剤を加え、タンパク質及び／又はペプチドを蛍光標識する、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

蛍光標識したタンパク質及び／又はペプチド試料を蛍光検出器付きイオン交換カラムHPLC、逆相分配HPLC、ゲル濾過HPLC、又は電気泳動に代表される分離手段に付し、蛍光をモニターしながらそのピーク画分を捕集する、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

蛍光画分を、各種ペプチダーゼ、トリプシン、キモトリプシンに代表されるタンパク質分解酵素を用いて酵素水解する、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

酵素水解物を蛍光検出器付き逆相HPLCに付し、蛍光ピークを検出すると共に、蛍光標識フラグメント及び蛍光非標識フラグメントの質量分析又はMS/MS分析を行う、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

質量分析又はMS/MS分析に付して得られた各フラグメントのイオン分子量情報を、コンピューターによるタンパク質及び／又はペプチドフラグメントデータベースと照合し、構造解析して、酵素水解以前のタンパク質及び／又はペプチドの同定を行う、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

被験試料が、生体試料から採取したタンパク質及び／又はペプチド試料である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

タンパク質及び／又はペプチドフラグメント情報、及び蛍光試薬で標識したアミノ酸の情報を含んだデータベースを用いてデータベース照合する、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法に使用する発現微量タンパク質及び／又はペ

プチド検出・分離・同定システムであって、被験試料のタンパク質及び／又はペプチドを蛍光試薬で標識するための第一反応器、蛍光試薬で標識した蛍光誘導体を蛍光分画するための1次元又は2次元の蛍光検出器付きHPLC、蛍光分画を酵素水解するための第二反応器、酵素水解物の蛍光標識フラグメントを蛍光検出するための第二段階の蛍光検出器付きHPLC、及び蛍光試薬で標識したアミノ酸の情報を含んだデータベースを搭載した構造解析装置の1種又は2種以上を構成要素として含むことを特徴とする上記検出・分離・同定システム。

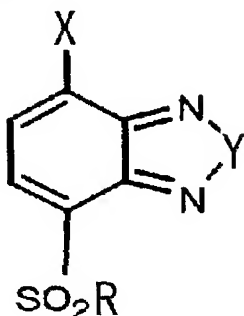
【請求項12】

上記第一反応器、1次元又は2次元の蛍光検出器付きHPLC、第二反応器、第二段階の蛍光検出器付きHPLCを直列に配置してなる、請求項11に記載のシステム。

【請求項13】

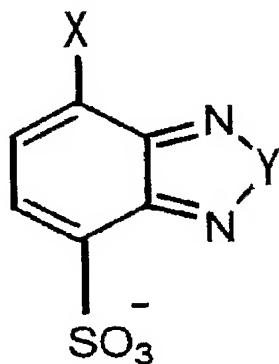
被験試料中のタンパク質及び／又はペプチドを、蛍光誘導体化試薬として、下記の化1の一般式(1)。

【化1】



〔式中、Xは、ハロゲン、Yは、O、Se又はS、Rは、 $-NH_2$ 、又は $-NHR'$ （但、 R' はジアルキル置換アルキル又はトリアルキル置換アルキル）を示す。〕で表わされる化合物、又は下記の化2の一般式(2)

【化2】

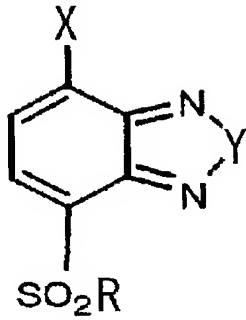


（式中、Xは、ハロゲン、Yは、Se又はSを示す。）で表わされる化合物、を用いて、蛍光誘導体とする、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

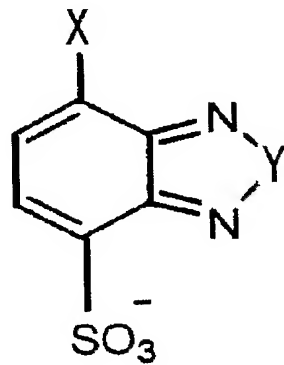
請求項1に記載の方法でタンパク質及び／又はペプチドを蛍光誘導化するために使用する蛍光誘導体化試薬であって、下記の化3の一般式(1)

【化3】



〔式中、Xは、ハロゲン、Yは、O、Se又はS、Rは、 -NH_2 、又は $\text{-NHR}'$ （但、 R' はジアルキル置換Nアルキル又はトリアルキル置換Nアルキル）を示す。〕で表わされる化合物、又は下記の化4の一般式（2）

【化4】



（式中、Xは、ハロゲン、Yは、Se又はSを示す。）で表わされる化合物、のいずれか1を有効成分とすることを特徴とする蛍光誘導体化試薬。

【書類名】明細書

【発明の名称】発現微量タンパク質／ペプチドの検出・分離・同定法

【技術分野】

【0001】

本発明は、微量の発現タンパク質及び／又はペプチドの検出・分離・同定方法に関するものであり、更に詳しくは、生体において遺伝子の発現により産生される微量の発現タンパク質及び／又はペプチドを簡便な方法で、高感度に検出し、同定することを可能とする新規な発現タンパク質及び／又はペプチドの検出・分離・同定方法、及びその同定システムに関するものである。

本発明は、ポストゲノム時代において重要な役割を果たすことが期待される、発現タンパク質及び／又はペプチドを網羅的に解析するプロテオーム技術における新しい検出・分離・同定手法を提供するものとして有用である。

【背景技術】

【0002】

ポストゲノム時代において重要な課題は、遺伝子を介して発現する発現タンパク質／ペプチドの微量検出とその分離・同定である。従来、この課題達成のために、2次元電気泳動後のペプチドフィンガープリント法が汎用されてきた（非特許文献1参照）。しかし、この方法は、煩雑な操作のために該方法の再現性に難点があった。この難点を克服する手法として、最近、多次元高速液体クロマトグラフィー（多次元HPLC）による分離・同定法、或いはICATによる手法が提案されている（非特許文献2参照）。

【0003】

これらのうち、タンパク質／ペプチドを、直接、多次元HPLCで分離・同定する方法は、全てのタンパク質／ペプチドを同時に処理するために、多大な労力と時間を要するという欠点がある。また、ICATによる手法は、チオール含有タンパク質／ペプチドのチオール基をisotope-coded affinity tags（ICAT reagent）で標識した後、それをビオチン結合カラムにて捕集し、これら全てを酵素水解し、得られたペプチドフラグメント混合物をHPLCで分離、質量分析計（MS）にて質量分析し、タンパク質／ペプチドを網羅的に解析しようとするものである。しかし、この方法は、チオール含有タンパク質／ペプチドの全てを酵素水解するため、大量に存在する目的以外のタンパク質／ペプチドのフラグメントが、目的とする微量タンパク質／ペプチドのフラグメントの検出及びその同定を妨害する、と言う欠点があり、当技術分野においては、更なる方法のブレークスルーが必要とされていた。

【0004】

【非特許文献1】Dunn MJ. Two-dimensional gel electrophoresis of proteins, J Chromatogr 1987; 418: 145-185

【非特許文献2】Gygi S. P, Rist B, Gerber S. A, Turecek F, Gelb M. H, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags, Nature Biotechnology 1999; 17: 994-999

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

このような状況の中で、本発明者らは、上記従来技術に鑑みて、上記従来技術における諸問題を抜本的に解決することを目標として鋭意研究を積み重ねた結果、従来法と異なり、被験試料中の蛍光標識可能なタンパク質及び／又はペプチドのみを蛍光選択的に分離した後、これを酵素水解に付し、分画した蛍光画分を質量分析、データベース照合、構造解析に供することにより、従来法では検出不可能であった微量の発現タンパク質及び／又は

ペプチドを高感度に検出し、同定することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】

本発明は、遺伝子を介して発現する微量の発現タンパク質及び／又はペプチドを、簡便な測定手法で、高感度に検出・分離・同定することを可能とする上記発現タンパク質及び／又はペプチドの微量検出・分離・同定方法を提供することを目的とするものである。

また、本発明は、上記微量検出・分離・同定方法に使用する微量の発現タンパク質及び／又はペプチドを、高感度で検出・分離・同定するための発現タンパク質及び／又はペプチド同定システムを提供することを目的とするものである。

更に、本発明は、従来法では検出することができなかった、遺伝子を介して発現する微量の発現タンパク質及び／又はペプチドを超高感度で検出・分離・同定することを可能とする新しい分析方法及び手段を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記課題を解決するための本発明は、以下の技術的手段から構成される。

(1) 被験試料中の発現微量タンパク質及び／又はペプチドを高感度に検出・分離・同定する方法であって、被験試料中のタンパク質及び／又はペプチドを蛍光誘導体とした後、これを蛍光検出により分離し、その蛍光画分を質量分析に付するか、又はその蛍光画分を酵素水解に付し、そのペプチド断片を分離し、その画分を質量分析に付し、データベース照合、構造解析に供して発現タンパク質及び／又はペプチドの同定を行うことを特徴とする上記発現タンパク質及び／又はペプチドの検出・分離・同定方法。

(2) 被験試料中のタンパク質及び／又はペプチドを蛍光誘導体とした後、HPLCに付し、その蛍光分画を捕集した後、酵素水解に付し、その蛍光標識フラグメント及び非蛍光標識フラグメントを質量分析又はMS/MS分析して得られた各フラグメントのイオン分子量情報をタンパク質及び／又はペプチドフラグメントデータベースと照合し、構造解析する、前記(1)に記載の方法。

(3) (a) 被験試料中のタンパク質及び／又はペプチドを蛍光試薬で標識する、(b) それを1次元又は2次元のHPLC/蛍光検出により、その蛍光分画を捕集する、(c) 上記蛍光分画を酵素水解に付する、(d) それを第二段階のHPLC/蛍光検出により、その蛍光クロマトグラムを得ると共に、その全ピークを質量分析に付し、データベース照合、構造解析に供する、前記(1)に記載の方法。

(4) タンパク質及び／又はペプチド試料の水溶液に、官能基特異的蛍光試薬を加え、場合により、界面活性剤及び／又はタンパク変性剤を加え、タンパク質及び／又はペプチドを蛍光標識する、前記(1)から(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 蛍光標識したタンパク質及び／又はペプチド試料を蛍光検出器付きイオン交換カラムHPLC、逆相分配HPLC、ゲル濾過HPLC、又は電気泳動に代表される分離手段に付し、蛍光をモニターしながらそのピーク分画を捕集する、前記(1)から(3)のいずれかに記載の方法。

(6) 蛍光分画を、各種ペプチダーゼ、トリプシン、キモトリプシンに代表されるタンパク質分解酵素を用いて酵素水解する、前記(1)から(3)のいずれかに記載の方法。

(7) 酵素水解物を蛍光検出器付き逆相HPLCに付し、蛍光ピークを検出すると共に、蛍光標識フラグメント及び蛍光非標識フラグメントの質量分析又はMS/MS分析を行う、前記(1)から(3)のいずれかに記載の方法。

(8) 質量分析又はMS/MS分析に付して得られた各フラグメントのイオン分子量情報を、コンピューターによるタンパク質及び／又はペプチドフラグメントデータベースと照合し、構造解析して、酵素水解以前のタンパク質及び／又はペプチドの同定を行う、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

(9) 被験試料が、生体試料から採取したタンパク質及び／又はペプチド試料である、前記(1)から(3)のいずれかに記載の方法。

(10) タンパク質及び／又はペプチドフラグメント情報、及び蛍光試薬で標識したアミ

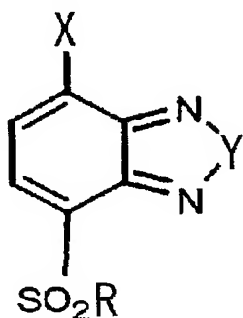
ノ酸の情報を含んだデータベースを用いてデータベース照合する、前記(1)から(3)のいずれかに記載の方法。

(11) 前記(1)から(10)のいずれかに記載の方法に使用する発現微量タンパク質及び／又はペプチド検出・分離・同定システムであって、被験試料のタンパク質及び／又はペプチドを蛍光試薬で標識するための第一反応器、蛍光試薬で標識した蛍光誘導体を蛍光分画するための1次元又は2次元の蛍光検出器付きHPLC、蛍光分画を酵素水解するための第二反応器、酵素水解物の蛍光標識フラグメントを蛍光検出するための第二段階の蛍光検出器付きHPLC、及び蛍光試薬で標識したアミノ酸の情報を含んだデータベースを搭載した構造解析装置の1種又は2種以上を構成要素として含むことを特徴とする上記検出・分離・同定システム。

(12) 上記第一反応器、1次元又は2次元の蛍光検出器付きHPLC、第二反応器、第二段階の蛍光検出器付きHPLCを直列に配置してなる、前記(11)に記載のシステム。

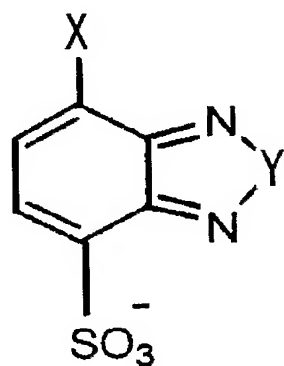
(13) 被験試料中のタンパク質及び／又はペプチドを、蛍光誘導体化試薬として、下記の化5の一般式(1)

【化5】



〔式中、Xは、ハロゲン、Yは、O、S e又はS、Rは、 $-NH_2$ 、又は $-NHR'$ （但し、 R' はジアルキル置換Nアルキル又はトリアルキル置換Nアルキル）を示す。〕で表わされる化合物、又は下記の化6の一般式(2)

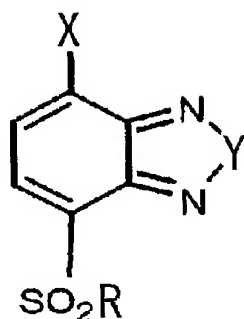
【化6】



（式中、Xは、ハロゲン、Yは、S e又はSを示す。）で表わされる化合物、を用いて、蛍光誘導体とする、前記(1)に記載の方法。

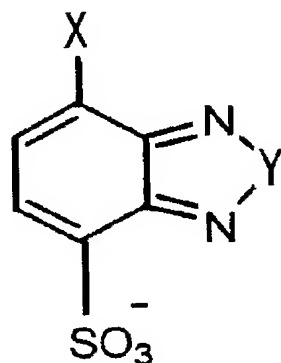
(14) 前記(1)に記載の方法でタンパク質及び／又はペプチドを蛍光誘導体化するために使用する蛍光誘導体化試薬であって、下記の化7の一般式(1)

【化7】



〔式中、Xは、ハロゲン、Yは、O、Se又はS、Rは、 $-NH_2$ 、又は $-NHR'$ （但し、R'はジアルキル置換Nアルキル又はトリアルキル置換Nアルキル）を示す。〕で表わされる化合物、又は下記の化8の一般式（2）

【化8】



（式中、Xは、ハロゲン、Yは、Se又はSを示す。）で表わされる化合物、のいずれか1種を有効成分とすることを特徴とする蛍光誘導体化試薬。

【0008】

次に、本発明について更に詳細に説明する。

本発明は、上記従来法の難点を克服するためになされたものであり、1) 微量の発現タンパク質／ペプチドを蛍光試薬で標識し、2) それをHPLC／蛍光検出にて第一段の分離・蛍光検出を行い、3) その蛍光分画（コントロール試料と比べて、被験試料に特異的に増減する蛍光画分）のみを捕集後、酵素水解し、それを第二段のHPLC／蛍光検出にて分離し、蛍光ピークの確認を行った後、HPLC／MSに付し、蛍光標識タンパク質／ペプチドフラグメントの同定を行い、当該微量タンパク質／ペプチドの特定を行う方法に関するものである。尚、タンパク質／ペプチド試料が純度の高い場合には、第一段のHPLC／蛍光検出による分離を省くことができる。本発明の方法は、従来法と異なり、蛍光標識可能なタンパク質／ペプチドのみを特異的に抽出し、検出・同定することができるという特徴を有し、微量の発現タンパク質／ペプチドを特定するために尤も相応しい方法である。

【0009】

本発明では、被験試料として、生体から採取したあらゆる種類のタンパク質及び／又はペプチドを含む試料が対象とされる。本発明の方法では、被験試料中の微量の発現タンパク質／ペプチドを蛍光試薬で標識し、蛍光誘導体化するが、この場合、タンパク質／ペプチド水溶液に、官能基特異的蛍光試薬を加え、場合により、界面活性剤及び／又はタンパク変性剤を加え、発現タンパク質／ペプチドを定量的に誘導体化することが重要である。即ち、本発明では、タンパク質／ペプチド試料の水溶液に、界面活性剤と場合によっては還元剤を添加し、これに官能基特異的蛍光試薬を加え、必要により、加温することにより

、タンパク質及び／又はペプチドを蛍光標識する。本発明では、上記界面活性剤として、非イオン性、陰イオン性、陽イオン性及び両イオン性界面活性剤が用いられる。また、本発明では、上記還元剤として、好適には、Tris (2-carboxyethyl) phosphine、tributyl phosphineが用いられるが、これらに制限されるものではなく、同効のものであれば同様に使用することができる。

【0010】

本発明において、上記官能基特異的蛍光試薬として、(例えば、4-Fluoro-7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole (NBD-F)、5-(N, N-Dimethylamino) naphthalene-1-sulfonyl chloride (DNS-CL)、Orthophthalaldehyde (OPA)、Fluorescamine、9-Fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) 等のアミノ基特異的蛍光試薬、Ammonium 7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazole-4-sulfonate (SBD-F)、4-(Aminosulfonyl)-7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazole (ABD-F)、4-(Acetylaminosulfonyl)-7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazole (AcABD-F)、4-Fluoro-7-trichloroacetylaminosulfonyl-2, 1, 3-benzoxadiazole (TcAcABD-F)、monobromobimane等のチオール基特異的蛍光試薬、4-Nitro-7-N-piperazino-2, 1, 3-benzoxadiazole (NBD-PZ)、4-N, N-Dimethylaminosulfonyl-7-N-piperazino-2, 1, 3-benzoxadiazole (DBD-PZ) と縮合剤との組み合わせによるカルボキシル基特異的蛍光試薬、又は、4-(N-Chloroformylmethyl-N-methyl) amino-7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole (NBD-COCL) 等の水酸基用蛍光試薬) が例示されるが、これらに制限されない。

【0011】

本発明においては、必要により、加温する(例えば、30-100℃、望ましくは40-70℃で10-300分間、望ましくは60-180分間)ことにより、タンパク質／ペプチドを蛍光標識する。その後、反応液のほぼ全量を蛍光検出器付きイオン交換カラムHPLC、又は逆相分配HPLC、又はゲル濾過HPLCに付し、蛍光をモニターしながらピーク分画を分取する。この場合、蛍光検出は、標識蛍光体の励起・蛍光波長に相当する波長に設定して行う。例えば、NBD-F、又はSBD-Fで標識した場合には、励起波長480nm或いは380nm、励起波長520nm又は505nmに設定する。イオン交換HPLCの場合には、塩、例えば、食塩、硫酸ナトリウム、過塩素酸カリウム、酢酸アンモニウムなど、望ましくは酢酸アンモニウムのような揮発性の塩を段階的に増量し、それぞれの画分を得る。この画分そのもの又はこの画分を濃縮・乾固した試料を、酵素水解に付す。酵素としては、各種ペプチダーゼ、トリプシン、キモトリプシンなど、適宜のタンパク質分解酵素が用いられる。この際、酵素カラムを接続してオンラインで酵素水解を行うこともできる。

【0012】

この溶液の一部を蛍光検出器付き逆相分配HPLCに付し、蛍光標識体の溶出位置を確認する。次いで、この逆相HPLCカラムの出口を質量分析計(どの様な質量分析計でも対応可能であるが、望ましくはエレクトロスプレー型質量分析計を用いる)に接続し、酵素水解物の蛍光標識フラグメント及び蛍光非標識フラグメントの質量分析(蛍光標識フラグメントは一回の質量分析、蛍光非標識フラグメントは親イオンを更に質量分析する)又は質量分析／質量分析(MS/MS)を行う。この際、蛍光検出器と質量分析計を直列に接続することも可能である。このようにして得られた各フラグメントのイオン分子量情報を、コンピューターに接続したタンパク質／ペプチドフラグメントデータベースと照合し、構造解析することにより、酵素水解以前のタンパク質／ペプチドの同定を行う。この場

合、本発明では、タンパク質及び／又はペプチドフラグメント情報、及び蛍光試薬で標識したアミノ酸の情報を含んだデータベースを用いてデータベース照合を行う。

【0013】

本発明では、発現タンパク質及び／又はペプチドを含む被験試料中のタンパク質及び／又はペプチドを蛍光誘導体化し、この蛍光誘導体をHPLC／蛍光検出で分離し、蛍光ピークの強さを比較して標的発現タンパク質及び／又はペプチドの蛍光誘導体を分離し、得られた標的発現タンパク質及び／又はペプチドのピーク画分を酵素分解し、次いで、質量分析又はMS／MS分析、データベース照合、構造解析により、上記タンパク質及び／又はペプチドを同定する。タンパク質及び／又はペプチドのアミノ基、チオール基、水酸基及びカルボキシル基などの機能性部分を誘導化するための多くの蛍光試薬が存在するので、本発明では、その目的に応じて、適当な試薬を任意に選択して使用することができる。後記する実施例に示されるように、例えば、Cys-含有タンパク質を誘導化するためには、チオール基に特異的な試薬である、Ammonium 7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazole-4-sulfonate (SBD-F)を使用することができる。図1に、本発明の方法のプロセスの一例を模式的に示す。後記する実施例に示されるように、実際、このようにして、ラットに10mgのデキサメタゾンを投与して2日後のランゲルハンス島におけるPancreatic polypeptide、プロインシュリン 2、78KD Glucose-regulated protein、プロテイン結合フォスファチジルアミン及びチオレドキシンが強く誘導されたことが示された。

【0014】

本発明の方法で重要な点は、各組織におけるタンパク質の量は、HPLC／蛍光検出で分離する前に、例えば、正常組織と非正常組織との組織間で定量、比較されるべきであることから、標的発現タンパク質を定量的に誘導体化することである。そのために、本発明では、適宜の界面活性剤が用いられるが、例えば、いくつかの界面活性剤についてBSAにより検討したところ、CHAPSがn-Dodecyl- β -D-maltopyranosideと比べて高い強度を示した(図2参照)。本発明では、pH、温度、反応時間及び誘導体化反応の添加剤等について、標的発現タンパク質及び／又はペプチドに応じて、最適条件を設定することで定量的な蛍光誘導体化が可能である。本発明では、これらの条件は、発現タンパク質／ペプチドの種類、分析目的等に応じて、適宜設定することができる。本発明の方法により、試験タンパク質／ペプチドのクロマトグラムは単一の蛍光ピークを示した(図3参照)。本発明の方法において、タンパク質及び／又はペプチドの検出限界は、0.2-6.0 fmolであり、最適条件下での10-1000 fmolの範囲で良好な直線($\gamma > 0.9994$)の測定曲線が得られ(表1参照)、検出性能は、従来法に比べて、顕著であることが分かる。表1に、蛍光検出／HPLCによる各種タンパク質及び／又はペプチドの検出限界を示した。

【0015】

【表1】

Peptides and proteins	Molecular weight (Da)	Number of cystein residues	Detection limit (f mol)	Calibration curve (r)
vasopressin	1084	2	5	0.9998
calcitonin	3418	2	6	0.9994
somatostatin	1638	2	1.8	0.9999
oxytocin	1007	2	1.3	0.9997
amylin	3920	2	1.2	0.9997
leptin	16014	2	3	0.9999
alpha1-acid glycoprotein	21547	4	1.3	0.9995
insulin	5808	6	0.7	0.9999
alpha-lactalbumin	16228	8	0.5	0.9999
albumin	66385	35	0.2	0.9999

【0016】

更に、本発明では、上記方法に使用する微量の発現タンパク質及び／又はペプチド検出・分離・同定システムとして、被験試料のタンパク質及び／又はペプチドを蛍光試薬で標識するための第一反応器、蛍光試薬で標識した蛍光誘導体を蛍光分画するための1次元又は2次元の蛍光検出器付きHPLC、蛍光分画を酵素水解するための第二反応器、酵素水解物の蛍光標識フラグメントを蛍光検出するための第二段階の蛍光検出器付きHPLC、及び蛍光試薬で標識したアミノ酸の情報を含んだデータベースを搭載した構造解析装置の1種又は2種以上を構成要素として含む上記検出・分離・同定システムが用いられる。この場合、上記第一反応器、2次元の蛍光検出器付きHPLC、第二反応器、第二段階の蛍光検出器付きHPLCを直列に配置することができる。これらの装置は、その使用目的に応じて、適宜の容量、形態に任意に設計することができる。

【0017】

本発明は、被験試料中のタンパク質及び／又はペプチドを、蛍光誘導体化試薬として、前記一般式(1)〔式中、Xは、ハロゲン、Yは、O、Se又はS、Rは、 $-NH_2$ 、又は $-NHR'$ （但し、R'はN置換アルキル）を示す。〕で表わされる化合物、又は前記一般式(2)（式中、Xは、ハロゲン、Yは、Se又はSを示す。）で表わされる化合物、を用いて、蛍光誘導体とすることができる。更に、本発明は、これらの化合物のいずれか1種を有効成分とする新規蛍光誘導体化試薬を提供することができる。

【0018】

これらの化合物の具体例としては、好適には、例えば、以下の例があげられるが、これらに制限されるものではなく、これらと同等ないし類似の化合物であれば同様に使用することができる。本発明の化合物は、後記する実施例に具体的に記載した方法と同様にして容易に合成することができる。

(1) DAABD-C1 [4-(dimethylaminoethyl aminosulfonyl)-7-chloro-2, 1, 3-benzoxadiazole]

(2) TAABD-C1 (7-chloro-2, 1, 3-benzoxadiazole-4-sulfonylaminoethyl trimethylammonium chloride)

(3) DAABD-F [4-(dimethylaminoethyl aminosulfonyl)-7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazole]

(4) TAABD-F (7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazole-4-sulfonylaminoethyl trimethylammonium chloride)

(5) DAABSeD-C1 [4-(dimethylaminoethyl aminosulfonyl)-7-chloro-2, 1, 3-benzoselenadiazole]

(6) TAABSeD-C1 (7-chloro-2, 1, 3-benzoselenadiazole-4-sulfonylaminoethyl trimethylammonium chloride)

thyl trimethylammonium chloride)

(7) D A A B S e D - F [4-(dimethylaminoethyl aminosulfonyl)-7-fluoro-2, 1, 3-benzoselenadiazole]

(8) T A A B S e D - F (7-fluoro-2, 1, 3-benzoselenadiazole-4-sulfonylaminoethyl trimethylammonium chloride)

(9) D A A B T h D - C l [4-(dimethylaminoethyl aminosulfonyl)-7-chloro-2, 1, 3-benzothiadiadiazole]

(10) T A A B T h D - C l (7-chloro-2, 1, 3-benzothiadiadiazole-4-sulfonylaminoethyl trimethylammonium chloride)

(11) D A A B T h D - F [4-(dimethylaminoethyl aminosulfonyl)-7-fluoro-2, 1, 3-benzothiadiadiazole]

(12) T A A B T h D - F (7-fluoro-2, 1, 3-benzothiadiadiazole-4-sulfonylaminoethyl trimethylammonium chloride)

【発明の効果】

【0019】

本発明により、1) 遺伝子を介して発現する発現タンパク質及び／又はペプチドを簡便な方法及び手段で、高感度に検出・分離・同定することができる、2) 本発明の方法により、従来法では検出できなかった微量の発現タンパク質及び／又はペプチドを短時間で、感度良く検出・分離・同定することができる、3) また、上記検出・分離・同定方法に使用する微量の発現タンパク質及び／又はペプチドの微量検出・分離・同定システムを提供することができる、4) 本発明は、プロテオームのプラットフォーム技術を提供するものとして有用である、という効果が奏される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

次に、実施例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明は、以下の実施例によって何ら限定されるものではない。

【実施例1】

【0021】

ラット脾ランゲルハンス島(ラ島)中チオール含有タンパク質／ペプチドの分離・同定
(1) ラ島中チオール含有タンパク質／ペプチドの蛍光誘導体化

ラ島に0.1Mホウ酸緩衝液(pH9.0)に溶解した6M塩酸グアニジン溶液50μlを加えて可溶化した。これに6M塩酸グアニジン溶液に溶解した17.5mMTCBP、17.5mMSBD-F、10mMEDTA及び50mMCHAPSをそれぞれ50μlずつ加え、混合した。この溶液を40℃にて3時間反応させることにより蛍光誘導体化を行った。

(2) イオン交換HPLCによる1次分離

上記の反応溶液をイオン交換カラムに付し、NaClのグラジエント(0、0.04、0.08、0.12及び0.3M)により蛍光タンパク質／ペプチドを溶出させ、5つのフラクションに分離した。なお、蛍光タンパク質／ペプチドの検出はSBD骨格の蛍光により行った。HPLC条件を以下に示す。

【0022】

(HPLC条件)

カラム: TSKgel DEAE-5PW 7.5×75mm(東ソー(株))

ガードカラム: C8-300-S 54.0×10mm(YMC(株))

移動相: 段階溶離 [0-5分: C100%、5-15分: A100%、15-25分: A87%B13%、25-35分: A73%B27%、35-45分: A60%B40%、45-55分: B100%]

A: 5mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)／アセトニトリル(50:50)

B: 5mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)／アセトニトリル(50:50)

(0.3MNaCl含有)

C: 5 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)

カラム温度: 室温 (約 25℃)

流速: 0.5 ml/min

検出: Ex 380 nm、Em 505 nm

注入量: 200 μ l

【0023】

(3) 逆相 HPLC による 2 次分離

上記の各画分を濃縮し、アセトニトリルを蒸発させた後、逆相カラムに付し、アセトニトリルの勾配溶離によりタンパク質/ペプチドをカラムから溶出させた。なお、タンパク質/ペプチドの検出は SBD 骨格の蛍光によりモニターした。HPLC 条件を以下に示す。

【0024】

(HPLC 条件)

カラム: カプセルパック C8 SG300 2.0 \times 100 mm (株) 資生堂)

移動相: 勾配溶離 (0 \rightarrow 60 分: B 40% \rightarrow 100%)

A: 0.05% トリフルオロ酢酸

B: 0.05% トリフルオロ酢酸/アセトニトリル (40:60)

カラム温度: 室温 (約 25℃)

流速: 0.2 ml/min

検出: Ex 380 nm、Em 505 nm

注入量: 50 μ l

【0025】

(4) 酵素処理

採取した画分をそれぞれのチューブに 0.5 M 炭酸水素アンモニウム溶液 5 μ l を加えてトリフルオロ酢酸を中和後、濃縮してアセトニトリルを蒸発させた。残渣 (約 80 μ l) に 20 μ g/ml トリプシン (プロメガ) 及び 10 mM 塩化カルシウムをそれぞれ 10 μ l ずつ添加した。これを 37℃ で 2 時間インキュベートし、MS/MS 測定用の試料とした。

【0026】

(5) MS/MS 測定によるタンパク質/ペプチドの同定

上記の試料を逆相カラム HPLC に付し、エレクトロスプレー法による MS/MS 測定を行った。HPLC 条件を以下に示す。なお、タンパク質/ペプチドの同定はデータベースに NCBI、サーチエンジンに MASCOT を使用した。

【0027】

(HPLC 条件)

カラム: Cadenza TC-C18 2.0 \times 100 mm (Imtakt (株))

移動相: 勾配溶離 (0 \rightarrow 30 分: B 20% \rightarrow 100%)

A: 0.1% ギ酸

B: 0.1% ギ酸/アセトニトリル (50:50)

カラム温度: 室温 (約 25℃)

流速: 0.2 ml/min

測定モード: positive

測定範囲: 500-3000 m/z

注入量: 50 μ l

【0028】

上記の方法により、約 130 のタンパク質/ペプチドのピークが分離できた。そのうち、約 50 のタンパク質/ペプチドが同定できた (表 2、図 6 参照)。

【0029】

【表 2】

Peak no.	Ratio (Dex/Control)	Protein	Mw	Database accession no.
12	0.5	protein P31	13284	CSRT31
15	0.4	dnaK-type molecular chaperone hsp72-psl	70884	S31716
24	2.1	pancreatic polypeptide	10968	NP_036758
29	0.5	insulin 2	5797	NP_062003
30	6.0	proinsulin 2	12331	NP_062003
36	1.9	78 KD glucose-regulated protein	72302	P06761
61	1.8	phosphatidylethanolamine binding protein	20788	NP_058932
121	1.8	thioredoxin	12854	NP_446252

【実施例 2】

【0030】

SBD-Fで誘導体化したBSAを、図1に示されるプロセスにより、トリプシンで酵素水解し、得られたペプチド混合物を逆相液体クロマトグラフィー（RPLC）で分離し、蛍光検出器で検出した。次いで、各ペプチドをESIイオンタップ質量分析計によるMS/MS分析に供した。原理的には、トリプシン分解により、BSAは、4個のアミノ酸残基以上の25のシステイン含有ペプチド及び35のシステイン非含有ペプチドが生成されるが、本実施例では、27以上の蛍光ペプチドが蛍光検出され、定量的に誘導体化が行われた（図4、A）。

【0031】

また、11のシステイン含有ペプチド及び17の非システイン含有ペプチドがマスキロマトグラフィーで検出された（図4、B）。図5に、 $(M+2H)^{2+}$ プレカーサー、 $m/z=873.4$ （図4で矢印で示した）から得たMS/MSスペクトルを示す。

全てのペプチドフラグメントのCIDスペクトルにより、確率的プロテイン同定法に基づくMASCOOTによるデータベース照合を行い、予測通り、完全にBSAとしてタンパク質を同定した（スコア：39）。

【実施例 3】

【0032】

デキサメタゾン（Dex）投与及び非投与のラット脾臓について試験した。

Dexは、肝臓のグルコース産生の増加とインシュリン耐性の誘導により主なヒト糖尿病であるタイプ2の糖尿病を誘発する。実際に、Dex処理の24時間後に、血中グルコースレベルは209.8mg/dLに達し、処理前の値の118.3mg/dLより著しく高い（ $p<0.05$ ）。本実施例では、2日間Dexで処理又は未処理のラット脾臓からランゲルハンス島（60島）を採取し、SBD-Fで誘導体化した。本発明の方法を生物試料に適用するための重要な態様は、タンパク質混合物からHPLCで発現タンパク質を分離することである。本実施例では、蛍光タンパク質は、まず、SBD-Fにより生成した多くのマイナス電荷と酸性アミノ酸部分に基づいてイオン交換クロマトグラフィー（IEC）で分離された。

【0033】

IECは、塩化ナトリウムの段階溶離（0、0.04、0.08、0.12、及び0.3M NaCl）により行い、蛍光タンパク質混合物を5つの画分として得た。次いで、各画分は、更に、それらの疎水性に基づいて、逆相液体クロマトグラフィー（RPLC）により分離された。この実験でのピークの容量（ $n=L/(4\sigma)$ ）、但し、Lは分析のトータル時間及び 4σ はピーク幅、としてのHPLCの性能の理論値）は、各RPLCフラクションにつき40と計算され、IEC-RPLC法の5つのステップのピーク容量は、約200であった。本実施例では、各RPLCサイクルで約3-50ピーク、合計で129ピークであった（図6）。

【0034】

微量タンパク質を検出するために、IECの段階溶離ステップを増やしてピーク容量を増加させた。未処理及びDex処理ラットから得られたRPLCクロマトグラムの全ての蛍光ピークを比較した。その結果、5本の蛍光ピークが1.8以上増加し、3本の蛍光ピークがDex処理で約1.5倍減少したことが見出された(表2)。表2に、Dex投与2日後の発現タンパク質の変化を示した。これらのタンパク質(即ち、標的発現タンパク質)は、広い小孔を有するRPLC(30nm小孔径)で分離され、トリプシンで分解し、各ペプチド混合物とした。各ペプチド混合物は、通常の小孔を有するRPLC(10nm小孔径)に供し、MS/MS分析した。データベース照合により、Dex処理後2日で増加したピークは、各々、膵臓ポリペプチド、プロインシュリン2、78KDグルコース-調節タンパク質、ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質、及びチオレドキシンであり、減少したピークは、各々、プロテイン31、dnak-タイプ分子キャペロンhsp72-ps1、及びインシュリンであった。

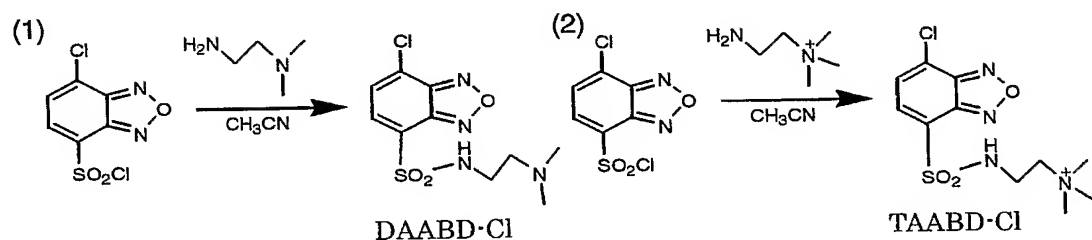
【実施例4】

【0035】

本実施例では、以下の化9の(1)及び(2)の反応式により、新規蛍光誘導体化試薬の合成を行った。

【0036】

【化9】



【0037】

(1) DAABD-Clの合成

4-chlorosulfonyl-7-chloro-2,1,3-benzoxadiazole(CBD-Cl)(126.53mg)をCH₃CNに溶解し、N,N-dimethylethylenediamineを滴下し、triethylamineを加えた。室温で約10分間攪拌後、反応液を減圧乾固した後、シリカゲルカラム(CH₂Cl₂)で精製し、4-(dimethylamino ethylaminosulfonyl)-7-chloro-2,1,3-benzoxadiazole(DAABD-Cl)(20.2 mg, 87.4%)を得た。

得られた化合物の確認データを以下に示す。

¹H-NMR (CD₃OD): 7.94 (1H, d, J=7.5), 7.65 (1H, d, J=7.5), 3.06 (2H, t, J=6.7), 2.30 (2H, t, J=6.7), 2.02 (6H, s)。ESI-MS: m/z 305 (M+H)⁺

【0038】

(2) TAABD-Clの合成

4-chlorosulfonyl-7-chloro-2,1,3-benzoxadiazole(CBD-Cl)(126.53mg)をCH₃CNに溶解し、H₂Oに溶かした aminoethyl trimethylammonium chlorideを滴下し、triethylamineを加えた。室温で約20分間攪拌後、反応液を減圧乾固した後、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)に溶かし、ODSカラムを用いて分取し、画分には、SBD-Cl(化10)が不純物として入っていたため、陰イオン交換カラムを用いて分取し、減圧乾固して、7-chloro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfoneaminoethyl trimethylammonium chloride (TAABD-Cl)(127.2 mg, 58.8%)を得た。

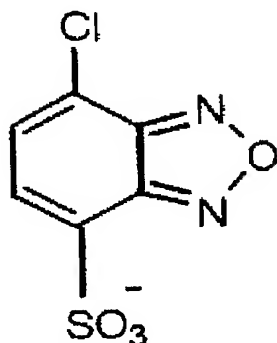
得られた化合物の確認データを以下に示す。

¹H-NMR (CD₃OD): 8.01 (1H, d, J=7.3), 7.69 (1H, d, J=7.3), 3.46-3.48 (4H, m), 3.

12 (9H, s)。ESI-MS : m/z 319 (M)⁺

【0039】

【化10】



【実施例5】

【0040】

本実施例では、新規蛍光誘導体化試薬の反応性について検討した。

DAABD-C、TAABDD-C1のSBD-Fとの比較

10 μ M還元型グルタチオン、システイン、ホモシステイン混合液100 μ LとDAABD-C1又はTAABD-C1 100 μ Lを混合し、pH 9、40℃、10～120分間反応させた。尚、各試薬は5 mM EDTA含む0.10 M ホウ酸緩衝液 (pH 9) に溶解した。0.1 % ぎ酸で反応停止後、生成物をHPLCを用いて測定した。

【0041】

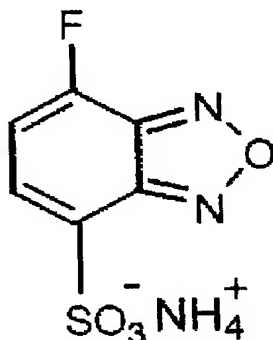
図7に、蛍光誘導体化反応時間と蛍光強度との関係 (左図: DAABD-C1、右図: TAABD-C1) を示す。

SBD-F (化11) の場合、40℃で誘導体化を行うと120分間の反応時間が必要であったが、DAABD-C1は10～20分、TAABD-C1は20～30分で反応が終了することがわかった。

したがって、反応時間はDAABD-C1の場合は20分、TAABD-C1の場合は30分が好適である。

【0042】

【化11】



【0043】

(2) 新規蛍光誘導体化試薬のMSでの感度

上記 (1) で作成したサンプルをLC-MSにより検出し、蛍光誘導体化試薬でラベル化していないもの及びSBD-Fで誘導体化したものと、相対強度を比較した。

【0044】

蛍光誘導体化試薬でラベル化していないcysteine、homocysteine、GSHの高さをそれぞれ1としたときの相対強度は表3の通りであった。これより、DAABD-C1がMSでの感度が最も高いことがわかった。また、移動相が酸性であるので、DAABD化誘導体はプラスに荷電され水溶性であると考えられる。

【0045】

【表 3】

	SBD-F	DAABD-Cl	TAABD-Cl
cysteine	23	3.0×10^3	2.0×10^3
homocysteine	4.0	2.3×10^2	1.6×10^2
GSH	1.6	2.1×10^2	1.7×10^2

【実施例 6】

【0046】

(1) TAABD-Cl のペプチドへの応用

10 μ M の以下に示した4種類のペプチド標品、17.5 mM TAABD-Cl、10 mM EDTA、50 mM CHAPS (界面活性剤)、2.5 mM TCEP (還元剤) それぞれ50 μ L を混合し、pH 9、40℃で、30、60、90、120 分間反応させた。尚、各試薬は6.0 M 塩酸グアニジン (タンパク変性剤) を含む0.10 M ホウ酸緩衝液 (pH9) に溶解した。生成したTAABD化ペプチドをHPLCを用いて測定した。

1. vasopressin
2. oxytocin
3. somatostatin
4. amylin (rat)

図 8 に TAABD-Cl との反応時間と蛍光強度との関係を示す。

図 8 より、反応時間が60分までは生成量が増加した。反応停止後は氷冷下で保存し、-20℃にて保存すると、48時間はほとんど分解しなかった。

【0047】

(2) DAABD化ペプチド・タンパクの検出限界

表 4 に示した 10 種類のペプチド・タンパク標品10 μ M 混合液、2.5 mM TCEP、17.5 mM DAABD-Cl、10 mM EDTA、50 mM CHAPSそれぞれ50 μ L を混合し、pH 9、40℃で、30分間反応させた。尚、各試薬は6.0 M 塩酸グアニジンを含む0.10 Mホウ酸緩衝液 (pH9) に溶解した。生成したDAABD化ペプチド・タンパクはHPLCを用いて測定し、蛍光検出の検出限界をSBD-Fと比較した。

【0048】

【表 4】

各種ペプチド・タンパクの HPLC・蛍光検出法による検出限界

Peptides and proteins	Molecular weight (Da)	Number of cystenyl residues	Detection limit (fmol)	
			DAABD-Cl	SBD-F
vasopressin	1084	2	7.0	5.0
oxytocin	1007	2	4.5	1.3
somatostatin	1638	2	20	1.8
calcitonin	3418	2	5.0	6.0
amylin (rat)	3920	2	4.5	1.2
insulin	5808	6	2.2	0.7
alpha1-acid glycoprotein	21547	4	8.5	1.3
alpha-lactalbumin	16228	8	3.5	0.5
albumin (BSA)	66385	35	0.5	0.2
leptin	16014	2	30	3.0

【0049】

(3) DAABD化ペプチド・タンパクの同定

上記 (2) で誘導体化した物質のうち、vasopressin、oxytocin、somatostatin、calci

tonin、amylinはLC-MSにより同定できた。それらの分子量を以下に示す。

m/z	541.8 (M+3H) ³⁺ [DAABD-vasopressin]
	516.0 (M+3H) ³⁺ [DAABD-oxytocin]
	726.6 (M+3H) ³⁺ [DAABD-somatostatin]
	989.9 (M+4H) ⁴⁺ [DAABD-calcitonin]
	892.8 (M+5H) ⁵⁺ [DAABD-amylin]

【0050】

これら全ての分子量は、それぞれのペプチドの2つのシステイン残基にDAABDが付加したとしたときの分子量であり、多価イオンピークの検出結果よりDAABD-Clによる誘導体化において、これらのペプチドのシステイン残基間のS-S結合が還元され、二つのチオール基両方に試薬が反応したことがわかった。

また、タンパク質の場合は酵素によってペプチドに分解する必要があるため、酵素トリプシンで消化し、LC-MS/MS検出及びMASCOTによるデータベース検索を行って同定を試みた結果、システインを含まないペプチドのアミノ酸配列を同定し、タンパク質を同定することができた。

【実施例7】

【0051】

(S B S e D-F の合成)

2-fluoroacetanilideを硝酸で処理して、1-acetylamino-2-nitro-6-fluorobenzeneとし、これを脱アルミ化して、2-fluoro-6-nitroanilineとし、次いで、パラジウム担持炭素触媒を用いて水素化して、3-fluoro-o-phenylenediamineを得た。

Selenium dioxideエタノール加熱溶液を、3-fluoro-o-phenylenediamine (60 mg, 0.48 mmol)のエタノール加熱溶液に加え、混合物を30分加熱した。これを、シリカゲルカラムによるクロマトグラフィーに供し、溶離液のジクロロメタンで溶出し、4-fluoro-2, 1, 3-benzoselenadiazoleを白色粉末 (88 mg) として得た。得られた化合物の確認データを以下に示す。

mp. 129°C、NMR (methanol-d₄): δ_H 7.55 (1H, d, J=9.2)、7.41 (1H, m)、7.06 (1H, m)、ESI-MS: m/z 202.8 [(M+H)]。

【0052】

このようにして得た4-fluoro-2, 1, 3-benzoselenadiazoleをfuming sulfuric acid (60%)に溶かし、130°Cで3時間還流した。この溶液を冷却し、冷水 (30 ml) に注ぎ、28% ammonium hydroxideで中和した。この中性溶液にエタノール100 mlを加え、濾過物を減圧乾固させた。残渣を水 (1.0 ml) に溶解し、更に、以下のHPLCで精製した。即ち、残渣の100 μlをHPLC分離に供した。S B S e D-Fに相当するフラクションを集め、減圧して白色粉末 (50 mg) を得た。得られた化合物の確認データを以下に示す。

m. P. > 300°C、NMR (methanol-d₄): δ_H 7.97 (1H, dd, J=7.6, J=5.4)、7.11 (1H, dd, J=7.6, J=10.1)、ESI-MS: m/z 280.8 [(M-H)]。

【実施例8】

【0053】

(S B T h D-F の合成)

N-thionylaniline (0.49g, 3.5 mmol)を3-fluoro-o-phenylenediamine (200mg, 1.6 mmol) トルエン (2 ml) 溶液に加えた。反応混合物を100-120°Cで4時間加熱し、溶媒を濾別した後、残渣をジクロロメタンに溶かし、溶液を10% HCl 溶液及び水で各々洗浄した。有機相を乾燥し、減圧乾固させた。これをシリカゲルによるクロマトグラフィーに供し、溶離液のクロロホルムで溶出し、4-fluoro-2, 1, 3-benzothiadiazoleを淡黄色油として得た。得られた化合物の確認データを以下に示す。

NMR (methanol-d₄): δ_H 7.69 (1H, d, J=8.9)、7.50 (1H, m)、7.20 (1H, m)、ESI-MS: m/z 154.9 [(M+H)]。

【0054】

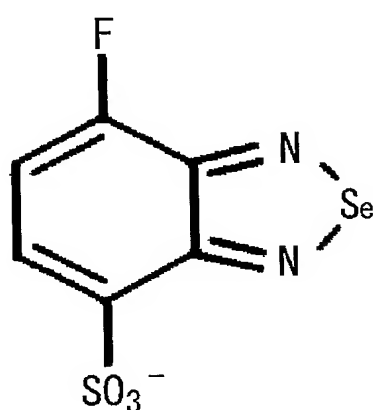
このようにして得た4-fluoro-2, 1, 3-benzothiadiazole (30ml) をfuming sulfuric acid (60%)に溶かし、130℃で3時間還流した。次いで、この溶液を冷却し、ゆっくり冷水(30ml)に注ぎ、28% ammonium hydroxideで中和した。中性溶液にエタノール100mlを加え、得られた濾過物を減圧乾固した。残渣を水(1.0ml)に溶かし、更に、以下の条件でHPLCで精製した。SBThD-Fに相当するフラクションを集め、減圧し、白色粉末(25mg)を得た。得られた化合物の確認データを以下に示す。

decomp. 265℃、NMR (methanol-d₄): δ_H 8.06 (1H, dd, J=7.9, J=4.9), 7.11 (1H, dd, J=7.9, J=9.8)、ESI-MS: m/z 232.8 [(M-H)]。

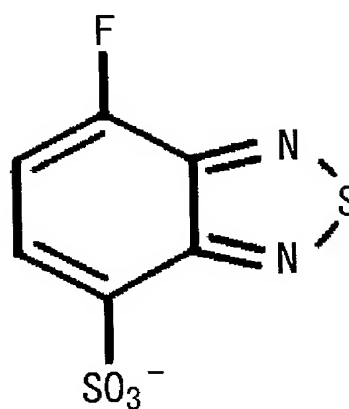
上記方法により合成したSBSeD-F及びSBThD-Fを下記の化12に示す。

【0055】

【化12】



SBSeD-F



SBThD-F

【実施例9】

【0056】

(1) システイン誘導体の蛍光スペクトル

1mMEDTAを含む0.1Mホウ酸緩衝液(pH9.0)による上記SBSeD-F、SBThD-F又はSBD-Fの各蛍光試薬溶液(4mM)の500μl部分を、0.1Mホウ酸緩衝液(pH9.0)によるシステイン(0.4mM)溶液の同量と混合した。この混合物を60℃で8時間放置した。反応の後、反応混合物をHPLC分離し、各システイン誘導体に相当するフラクションを集め、それらの蛍光スペクトルを測定した。

【0057】

SBSeD-FとSBThD-Fのシステインに対する反応性

4mMの各試薬、SBSeD-F、SBThD-F又はSBD-F及び1mMEDTAを含む0.1Mホウ酸緩衝液(pH9.0又はpH10)の500μl部分を、0.1Mホウ酸緩衝液(pH9.0又はpH10)によるシステイン溶液(0.4mM)の同量と混合した。反応混合物をHPLC分離し、60℃での反応をモニターした。

【0058】

(2) 結果

SBD-Fのような水溶性試薬は、そのsulfonic acid残渣により水溶液中での誘導体の可溶性を増加させ、結果として、誘導体の吸収又は沈殿が減少する。したがって、インシュリンのような比較的疎水性ペプチドのSBD-Fによる誘導体は、逆相カラムで溶出され、高感度に検出されたが、本実施例では、更に、benzoselenadiazole又はbenzothiadiazole骨格をもつ蛍光試薬としてSBSeD-F及びSBThD-Fを合成し、それらのシステインに対する反応性及びその誘

導体の蛍光特性を調べた。

【0059】

最大励起 (λ_{ex}) 及び発光波長 (λ_{em})、及び誘導体のリテンションタイムを表5に示す。各システム誘導体の mass number ([M+H]) は、SBSeD-F (m/z 381.9)、SBThD-F (m/z 334.0) 及びSBD-F (m/z 318.0) について、理論値 (各々 382.0、334.0 及び 318.0) と一致した。誘導体の最大励起波長は、SBSeD-F (340 nm) 及びSBThD-F (315 nm) はSBD-F (365 nm) より短く、誘導体の最大発光波長は、SBSeD-F (542 nm) は、SBSeD-F (517 nm) 及びSBD-F (514 nm) よりも長かった。SBSeD-F 自体は蛍光が少ないが、SBThD-F は多少の蛍光を与えた (λ_{ex} : 350 nm, λ_{em} : 424 nm)。SBSeD-F、SBThD-F 及びSBD-F のシステム誘導体の逆相カラム (C₁₈) に対する pH 2.0 の移動相によるリテンションタイム (t_R) は、各々 4.5、5.3 及び 4.8 分であった。これから、SBSeD-F は、これらの中で最も親水性の蛍光試薬であった。

【0060】

SBD-F の場合、至適反応条件は 60℃ で pH 9.5 で 1 時間であるが、SBSeD-F 及びSBThD-F の反応性は、SBD-F と比べて低く、蛍光強度は 8-24 時間で徐々に増加し (図 9、10)、24 時間後でも、反応は最大に達しなかった (図 9)。pH 10.0 及び 60℃ では、SBSeD-F 又はSBThD-F とシステムの量的反応時間は、8 時間以上であり、SBD-F では、1 時間以内に完全に反応した (図 10)。

このように、水溶性の蛍光試薬 SBSeD-F 及びSBThD-F は、SBD-F と比べて蛍光特性及び疎水性の点で異なっており、プロテオーム解析のための新規蛍光誘導体化試薬として有用である。

【実施例 10】

【0061】

DAABD-C1 による *C. elegans* タンパク質の誘導体化及び同定

(1) 方法

C. elegans (Bristol N2 株) を、*E. coli* の OP50 株を栄養源として 20℃ で、NGM 寒天上に培養し、M9 バッファーにより浮遊させてバクテリアから分離した。上記線虫を M9 バッファーで 2 回洗った後、-80℃ で保管して用いた。この線虫を等量の 10 mM CHAPS に懸濁し、超音波で溶解した。可溶性のフラクションを 4℃ で 10,000 rpm、5 分の遠心分離により集めた。上澄を可溶性フラクションとして -20℃ で保管した。このフラクションのタンパク質濃度を BSA を標準に用いる Bradford method で決定した。上澄の約 20 μ L (100 μ g タンパク質) を同容量の 2.5 mM TCEP, 17.5 mM DAABD-C1、10 mM Na₂EDTA 及び 50 mM CHAPS を 6.0 M グアニジンを含む 100 mM ホウ酸塩バッファー (pH 9.0) 中で混合した。反応混合物を 40℃ で 30 分インキュベートした後、反応を 200 μ L の 0.1% ギ酸で停止し、次いで、反応混合物 (10 μ g タンパク質) の 30 μ L を HPLC システムに注入した。

【0062】

RP カラムが PROTEIN (30 nm ポアサイズ、250 × 4.6 mm i.d.) (Imtakt)、移動相が溶離液 (A) 0.1% トリフルオロ酢酸及び溶離液 (B) 水 / CH₃CN / トリフルオロ酢酸 (70 / 30 / 0.1)、グラジエントシステムが流速 0.25 mL/min で 100 分以上の 30 から 70% B の条件で HPLC を行った。蛍光検出は 508 nm、励起波長は 387 nm で行った。同定のために、蛍光タンパク質誘導体のいくつかのピークフラクションを分離し、減圧下に 10 μ L に濃縮した。各フラクションは、2 μ g/mL トリプシン及び 1.0 mM 塩化カルシウムを含む 90 μ L の 5.0 mM 重炭酸アンモニウム溶液 (pH 7.8) で希釈し、37℃ で 2 時間インキュベートした。各タンパク質加水分解ペプチド混合物を直接 ESI イオントラップ質量分析装置を用いた LC-MS/MS に供した。クロマトグラフィーは、HP1090 シリーズ II システム

及び Cadenza TC-18 column (12 nm ポーラスシリカ、100×2.0 mm i. d.) のカラムを用いて実施した。移動相は溶離液 (A) 1.0 mM ギ酸アンモニウム及び溶離液 (B) 1.0 mM ギ酸アンモニウム / CH₃ CN (50/50) とした。グラジエント溶出は、流速 0.2 mL/min で 60 分以上の 0 から 100% で行った。タンパク質の同定は、システインのチオール残基に結合した DAABD を記憶する MASCOT (Matrix Science Ltd., U.K.) データベースサーチアルゴリズムを有する NCBI nr データベースを用いて実施した。

【0063】

(2) 結果

図 11 は、DAABD-C1 で誘導体化した、C. elegans の可溶性フラクションから得られたタンパク質 (約 10 µg) のクロマトグラムを示す。本実施例では、タンパク質の分離、トリプシンによる加水分解及び任意に選択されたピークフラクションの LC-MS/MS 同定により、10 種類のタンパク質が同定された。

図中、1 はリボゾームタンパク質 S3a (MW=28942)、2 はカルレティキュリン (calreticulin) 前駆体 (MW=45588)、3 はリボゾームタンパク質 L1 (MW=38635)、4 は伸長因子 (elongation factor) 1-アルファ (MW=50636)、5 はリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MW=35098)、6 は 40S リボゾームタンパク質 (MW=22044)、7 はビテログニン (vitellogenin) (MW=193098)、8 はアルギニンキナーゼ (MW=41969)、9 は HSP-1 熱ショック (heat shock) 70 kD タンパク質 A (MW=69680) 及び 10 はリボゾームタンパク質 L7Ae (MW=13992) を示す。本実施例では、任意に選択された 10 種類のタンパク質が同定されたが、本発明では、同様に、他のタンパク質の同定をすることが可能である。

【産業上の利用可能性】

【0064】

以上詳述したように、本発明は、微量の発現タンパク質及び／又はペプチドの検出・分離・同定方法及びそのシステムに係るものであり、本発明により、遺伝子を介して発現する発現タンパク質及び／又はペプチドを簡便な方法及び手段で、高感度に検出・分離・同定することができる。本発明の方法により、従来法では検出できなかった微量の発現タンパク質及び／又はペプチドを短時間で、感度良く検出・分離・同定することができる。また、上記検出・分離・同定方法に使用する微量の発現タンパク質及び／又はペプチドの微量検出・分離・同定システムを提供することができる。本発明は、プロテオームのプラットフォーム技術を提供するものとして有用である。

【図面の簡単な説明】

【0065】

【図 1】本発明の方法の操作工程の一例を示す。

【図 2】界面活性剤の種類と蛍光誘導体の生成の度合いとの関係を示す。

【図 3】本発明の方法により試験した蛍光誘導体タンパク質／ペプチドのそれぞれの蛍光ピークを示す。

【図 4】酵素水解物の蛍光クロマトグラム (A)、及びマスキングクロマトグラム (B) を示す。

【図 5】MS/MS によるマススペクトルを示す。

【図 6】実施例 3 における逆相クロマトグラフィー (RPLC) によるクロマトグラムを示す。

【図 7】蛍光誘導体化の反応時間と蛍光強度との関係を示す (左図: DAABD-C1, 右図: TAABD-C1)。

【図 8】TAABD-C1 との反応時間と蛍光強度との関係を示す。

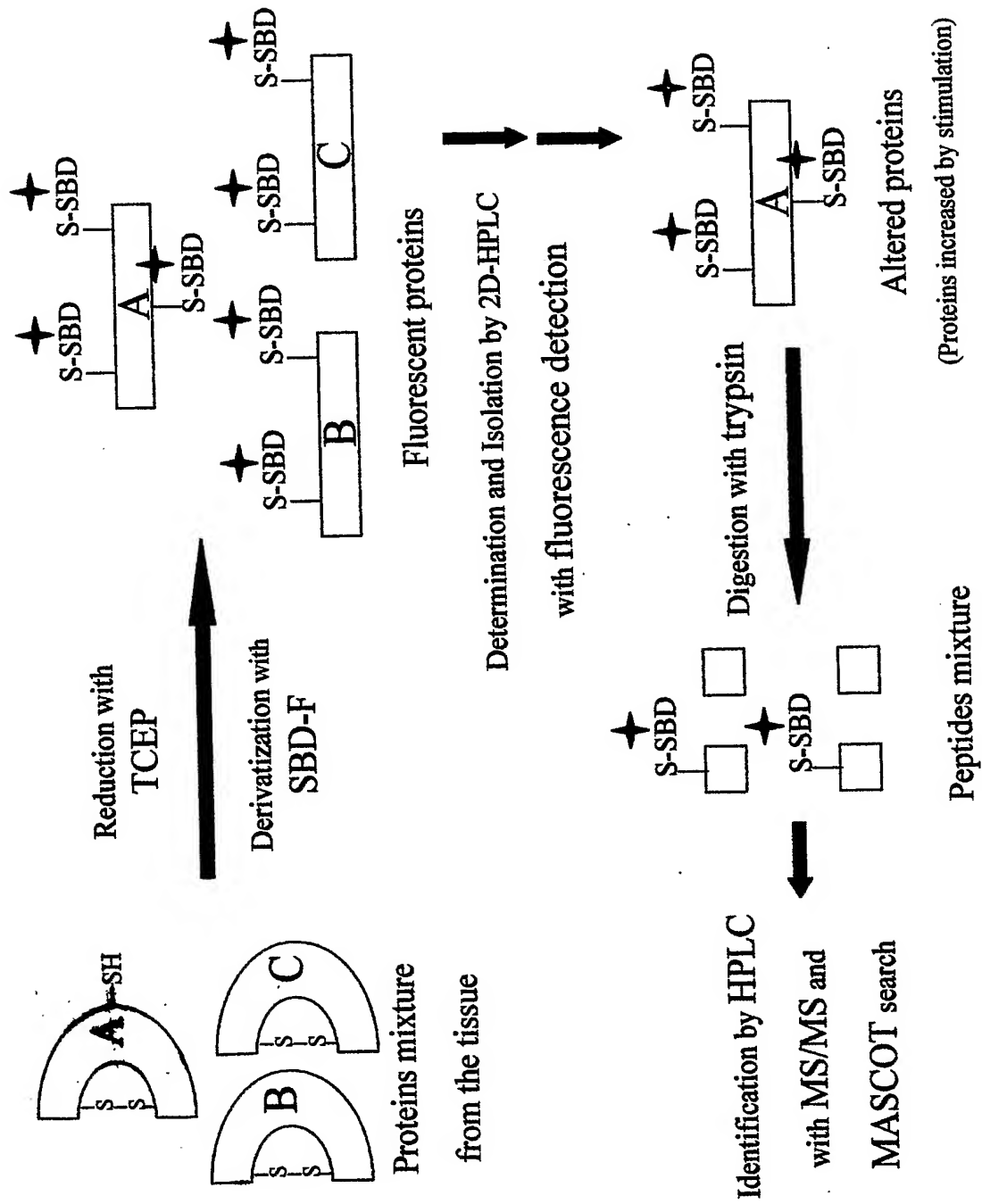
【図 9】新規蛍光試薬によるシステインの蛍光誘導体化 (pH 9.0) の反応時間とピーク領域との関係を示す。

【図 10】新規蛍光試薬によるシステインの蛍光誘導体化 (pH 10.0) の反応時

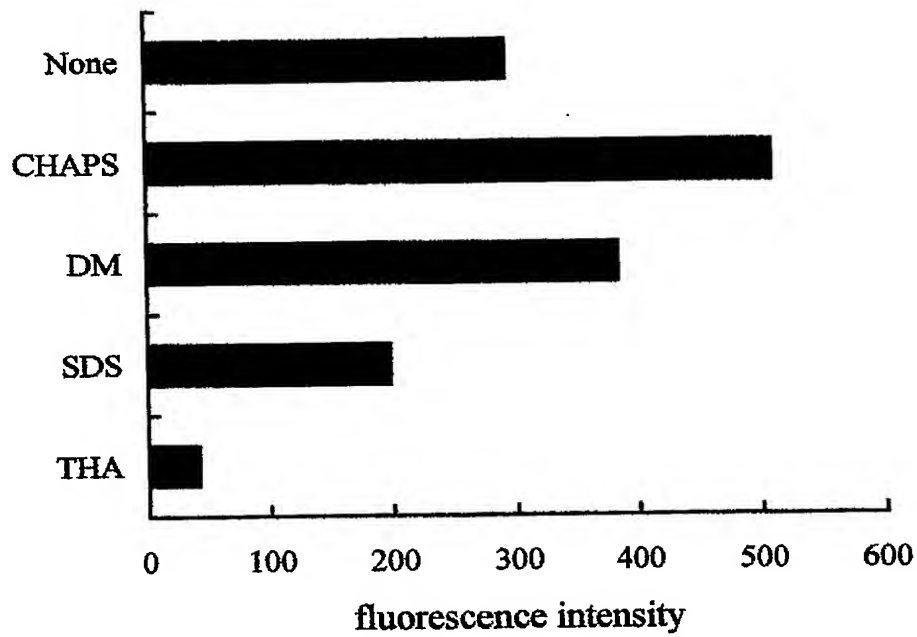
間とピーク領域との関係を示す。

【図 1 1】 DAABD-C 1 で誘導体化した、線虫 (*C. elegans*) の可溶性フラクションが得られたタンパク質 (約 1 0 μ g) のクロマトグラムを示す。

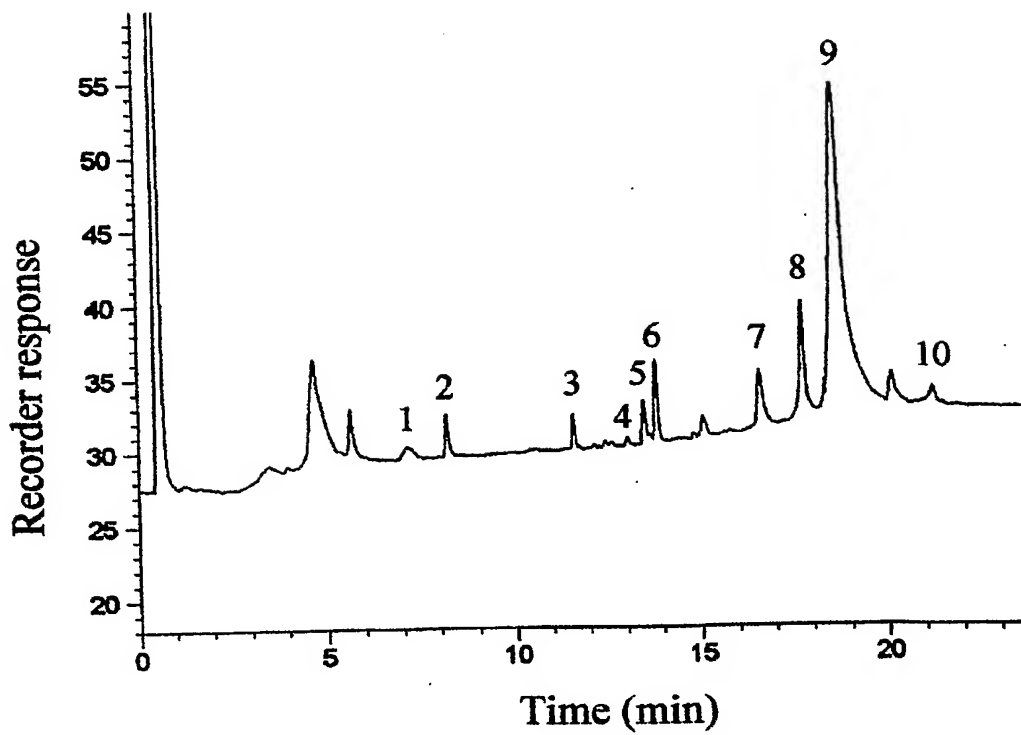
【書類名】 図面
【図 1】



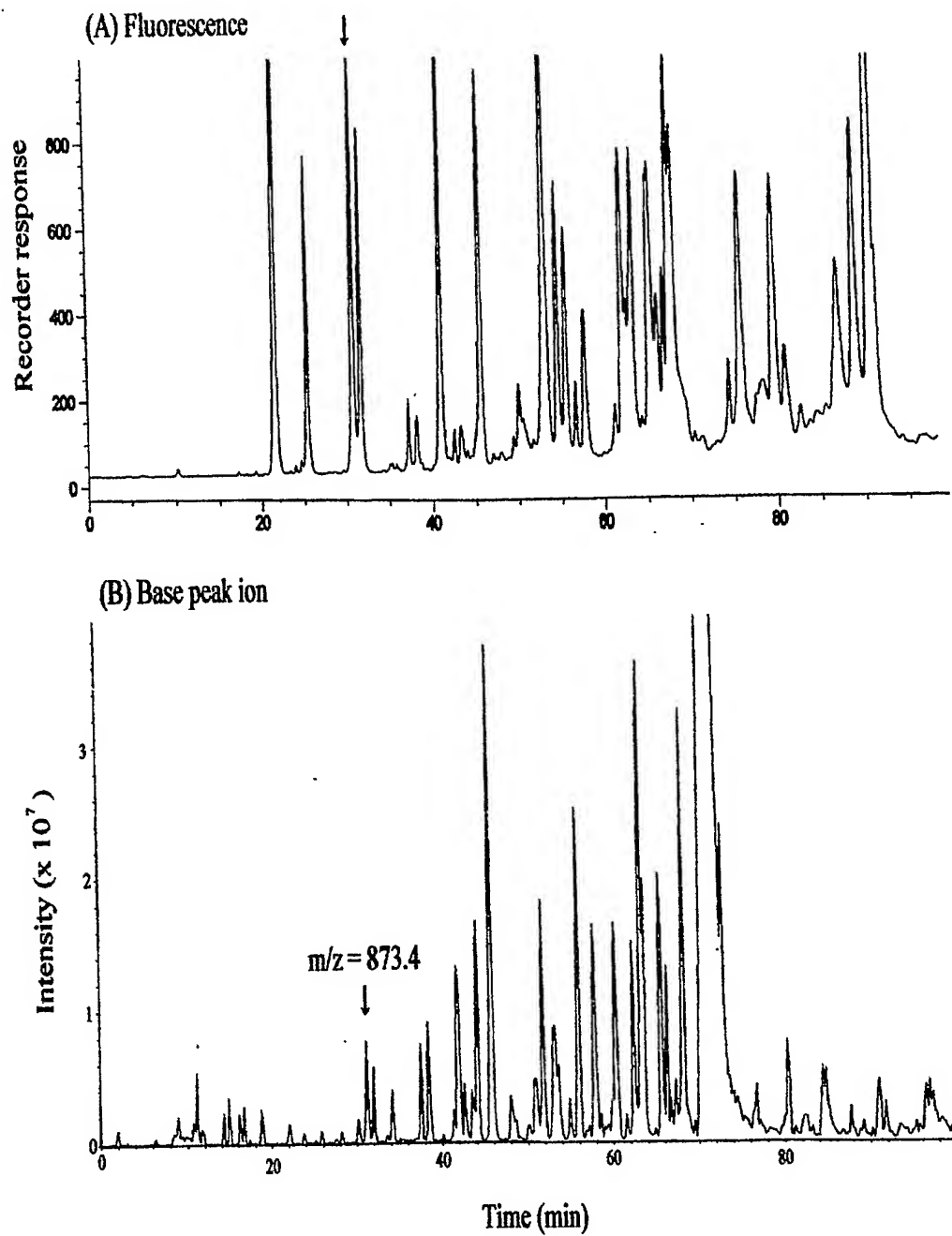
【図 2】



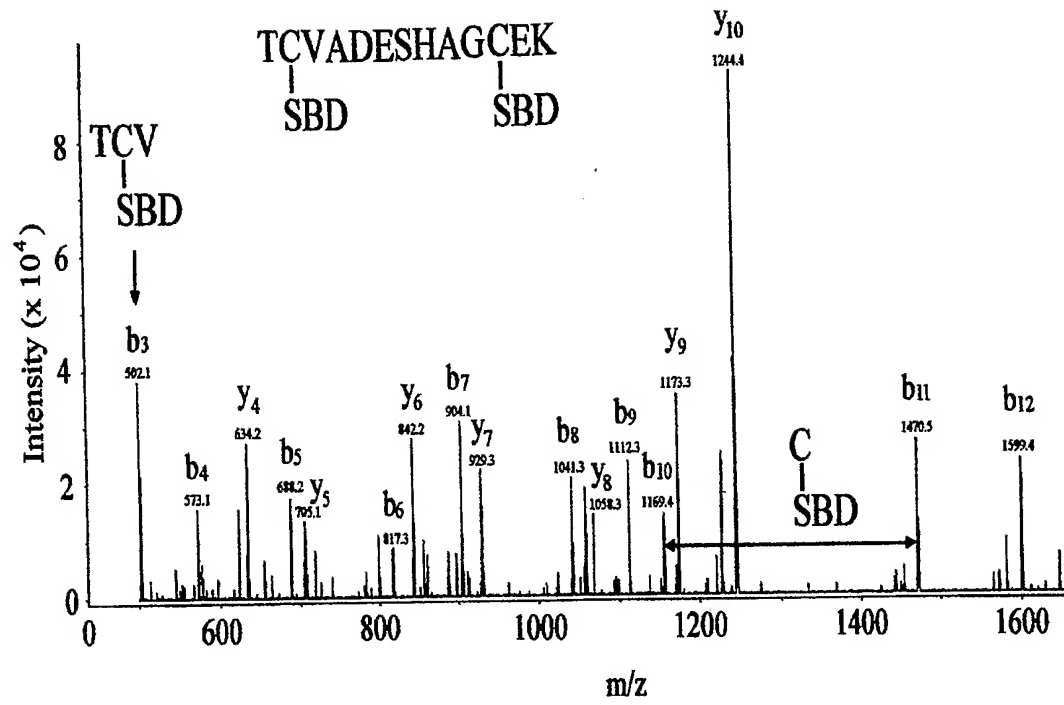
【図 3】



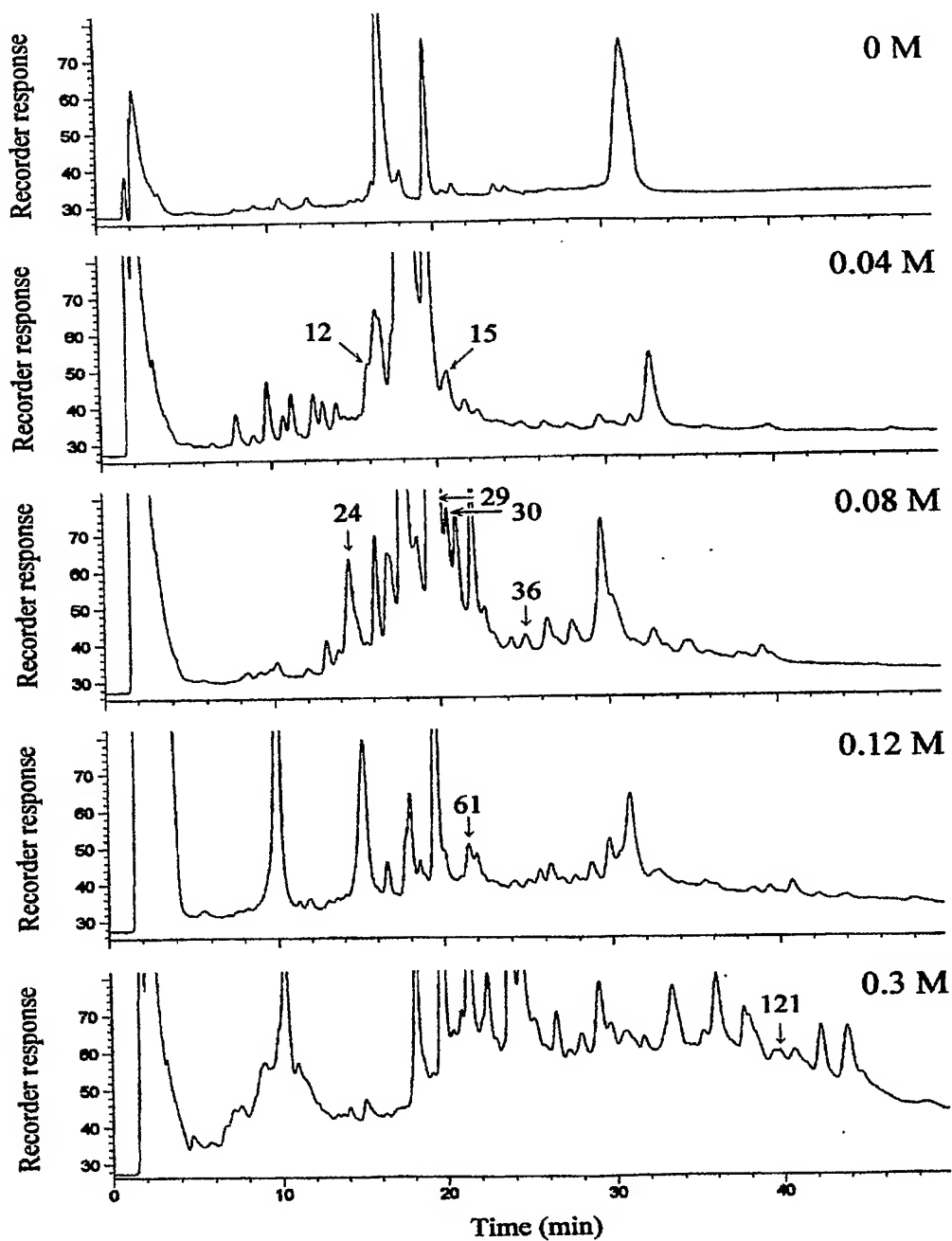
【図 4】



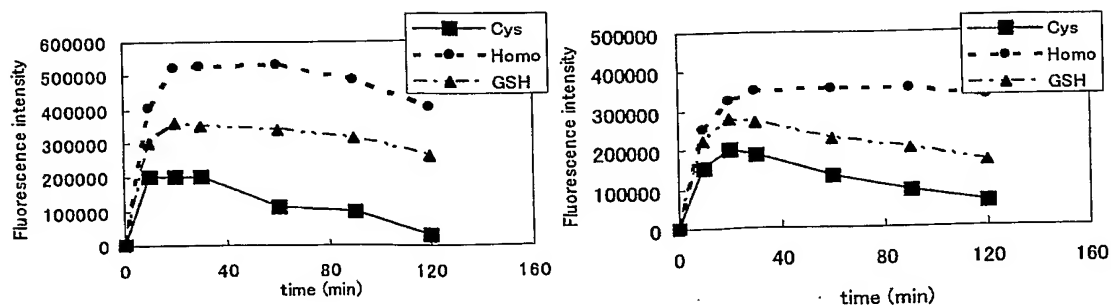
【図 5】



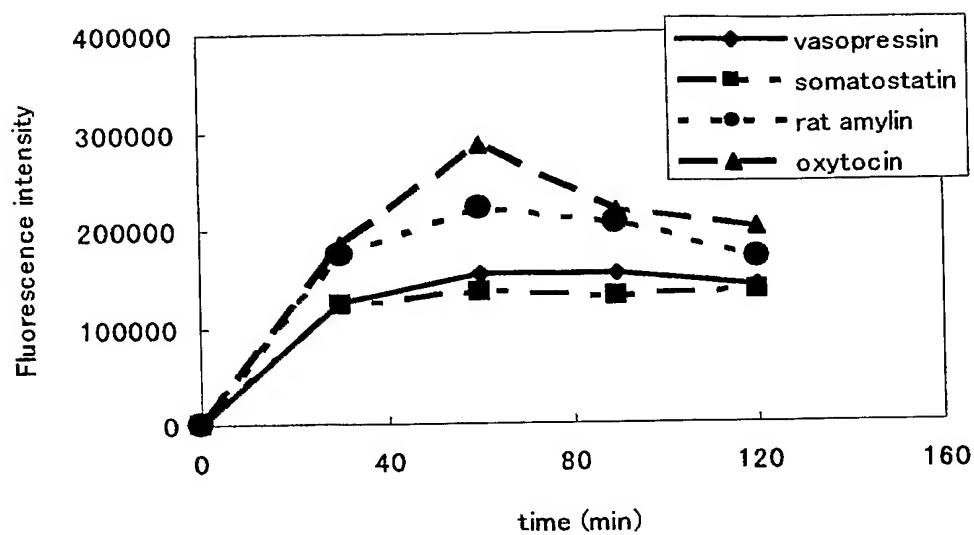
【図 6】



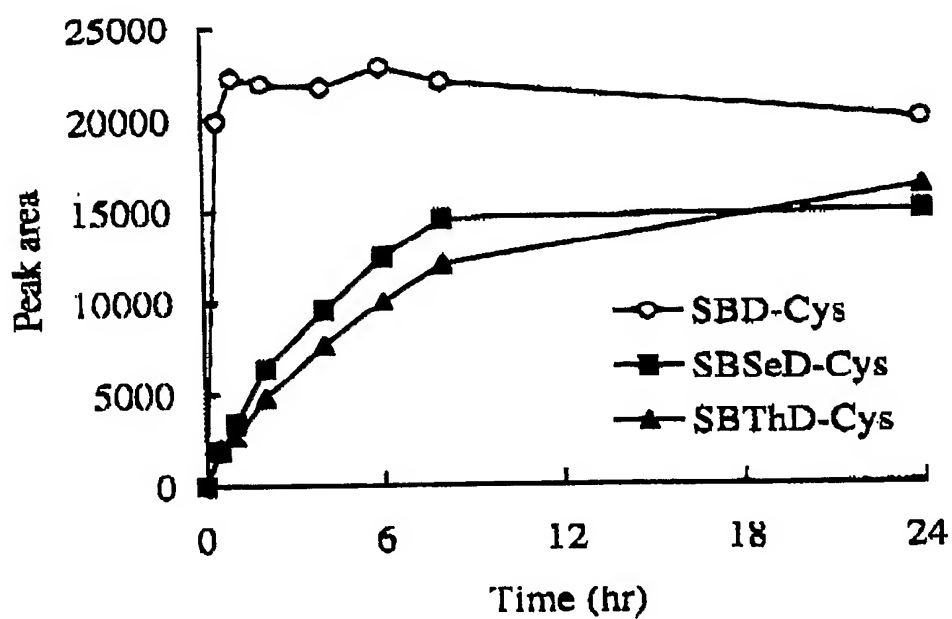
【図 7】



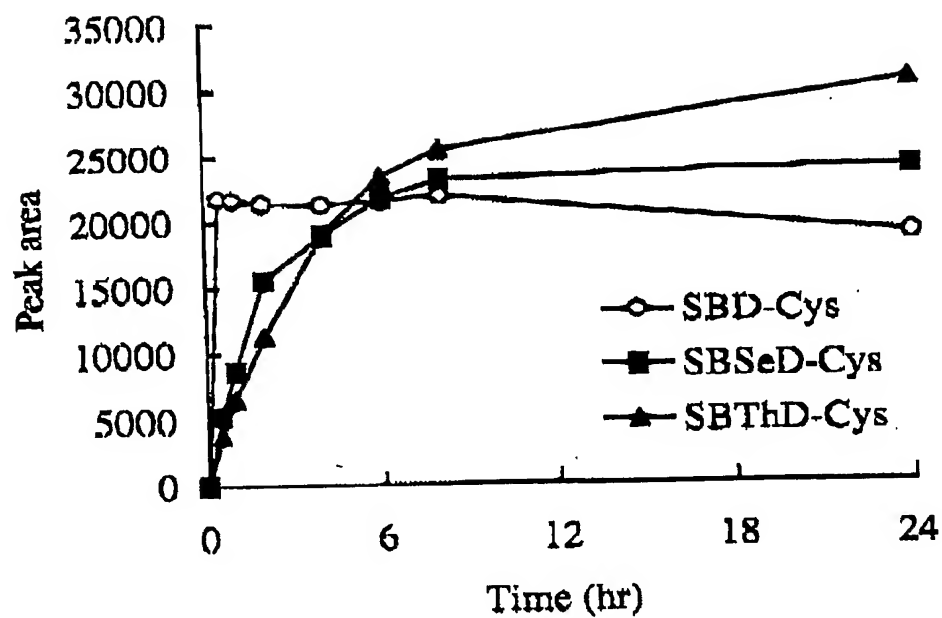
【図 8】



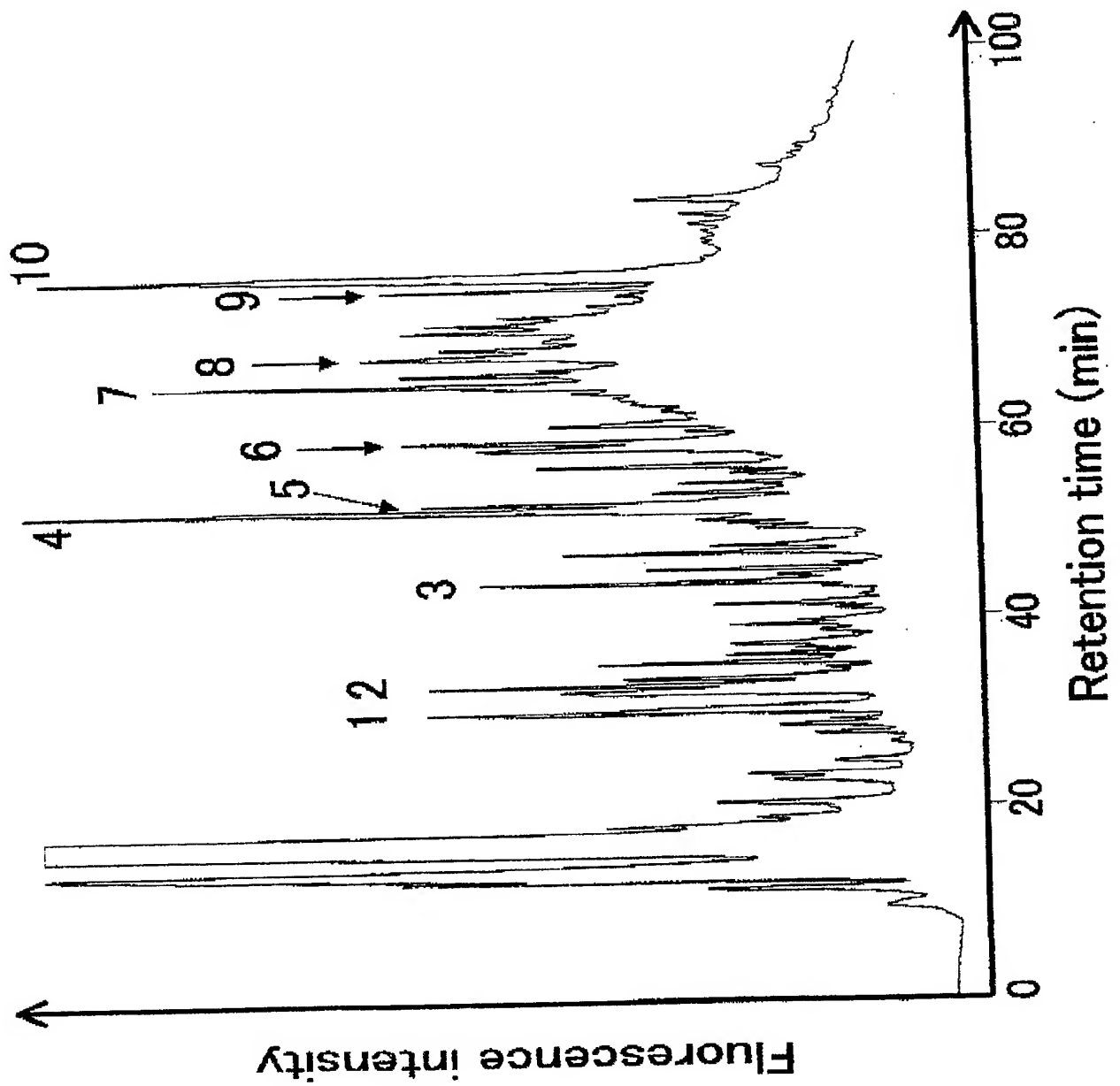
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 発現微量タンパク質／ペプチドの検出・分離・同定法及びそのシステムを提供する。

【解決手段】 微量の発現タンパク質及び／又はペプチドの検出・分離・同定方法であつて、蛍光試薬で標識した被験試料中のタンパク質及び／又はペプチドの蛍光誘導体を、HPLCに付し、その蛍光分画を捕集した後、酵素水解に付し、その蛍光標識フラグメント及び非蛍光標識フラグメントを質量分析して得られた各フラグメントのイオン分子量情報をタンパク質及び／又はペプチドフラグメントデータベースと照合し、構造解析することを特徴とする上記タンパク質及び／又はペプチドの検出・分離・同定方法、及びその同定システム。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 1 2 8 1 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 2 1 9 1 7 9 3]

1. 変更年月日	1 9 9 2 年 8 月 1 7 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都世田谷区代田 6 - 1 5 - 1 8
氏 名	今井 一洋